

論文の内容の要旨

論文題目: **Screening and functional analysis of downstream genes for the LIM homeodomain protein Xlim-1 in the Spemann organizer**

(シュベーマンオーガナイザーにおける LIM ホメオドメイン蛋白質 Xlim-1 の下流遺伝子の検索と機能解析)

氏名 日笠 弘基

両生類初期胚の背側中胚葉組織であるシュベーマンオーガナイザーの特徴として、顕著な形態形成運動と、外胚葉を神経化し中胚葉を背側化させてそのパターン形成を行うという誘導活性が挙げられる。そして、この二つの現象が協調的に作用することにより、初期胚のボディープランが正常に遂行されていくと考えられている。近年、シュベーマン・オーガナイザー領域に発現する種々の分泌性因子ならびに転写因子が単離され、それらがオーガナイザーの誘導活性に関わることが示唆された。しかし、それらの因子間における相互作用や遺伝子カスケードについての解析は未だ十分には行われていない。そこでアフリカツメガエルのオーガナイザーに特異的に発現する LIM ホメオドメイン蛋白質 Xlim-1 に着目した。Xlim-1 は1つのホメオドメインとその上流に一对の LIM ドメインを持つ転写活性化因子であり、さらに、アクチビンによる背側中胚葉誘導シグナルに直接的に発現誘導されることから、オーガナイザー形成の初期に機能することが予想される。さらに、mRNA 注入実験により、Xlim-1 は LIM ドメインの機能を欠失させると活性型となり腹側

中胚葉を背側化するほか、多分化能をもつ外胚葉外植体（アニマルキャップ）に対してはオーガナイザー特異的遺伝子である *chordin*、*gooseoid*、および *Xotx2* の遺伝子発現を促し、前方型神経を誘導するというオーガナイザー活性を模倣することが示された。以上のことから、*Xlim-1* はオーガナイザーにおいて中心的な役割をもつと予想され、その下流のシグナル経路の体系的な解析と、その結果同定された遺伝子の機能解析は、オーガナイザーの分子基盤を探る上で新たな知見を与えるものと考えられる。

第一部: *Xlim-1* の下流遺伝子の検索とその発現解析

(Searching for downstream genes of *Xlim-1* and their expression studies)

アフリカツメガエルのアニマルキャップは、液性因子処理および mRNA 注入法により多分化能を示すことから、アニマルキャップにおいて *Xlim-1* に発現誘導をうけるオーガナイザー特異的遺伝子を体系的に検索し、その発現解析を行った。活性型 *Xlim-1* の mRNA を注入したあるいは注入しないアニマルキャップを初期原腸胚期に回収して、差し引き cDNA ライブラリーを作成した。そして、このライブラリーをスクリーニングし 37 個のクローンを得た。次いで、活性型 *Xlim-1* によりアニマルキャップにおいて発現が引き起こされ、かつオーガナイザー領域で *Xlim-1* とその発現が重複する遺伝子を 6 個単離した。既知の遺伝子として、頭部誘導活性を持つ分泌性蛋白質 *cerberus* や前方型神経の分化に関与する *Xotx5* 等が *Xlim-1* の標的遺伝子の候補として新たに同定された。このことは *Xlim-1* が頭部およびそのパターン形成に関与するという先の報告と良い対応を示すとともに、この手法を用いたアプローチが有効であることも示唆している。

さらに、ヒトレセプター・チロシンキナーゼ *Ror2* のオーソログ (*Xror2*)、マウス分泌型メタロプロテアーゼ *ADAM-TS* のオーソログ (*XADAM-TS*) およびヒト p53 活性化遺伝子 *PA26* のオーソログ (*XPA26*) が同定された。*XPA26* は初期原腸胚のオーガナイザー領域での発現は検出されなかったが、その由来組織である脊索に非常に特異的に発現していた。これらの遺伝子が *Xlim-1* の制御を受けてオーガナイザーあるいは脊索において種々の役割を担っていることが示唆された。

第二部: レセプターチロシンキナーゼ Xror2 の発現と機能解析 (Expression pattern and functional analysis of Xror2)

Ror 遺伝子ファミリーは細胞外ドメインとして免疫グロブリン様ドメイン、frizzled 様ドメイン、kringle ドメインをもち、細胞内ドメインとしてはチロシンキナーゼドメインをもつ。Ror ファミリーの機能としてはこれまでに線虫における遺伝的解析において ror 遺伝子がニューロンの細胞移動に関連していること、マウスの Ror2 遺伝子の破壊により四肢の発生に異常が生じること等が報告されている。しかし Ror2 のリガンドおよび Ror2 を介するシグナル伝達系は不明であり、また Ror2 の機能ドメインの解析は充分には行われていない。(Wnt との結合が予想される frizzled 様ドメインが存在するが実際に Wnt との結合や Wnt との機能的関連を示唆する実験的証拠は報告されていない。)

本研究によって、Xror2 はオーガナイザー領域において Xlim-1 と発現が重複し、後期には脊索および予定後脳脊髄領域にも発現することが明らかとなった。そこでオーガナイザーでの Xror2 の役割を検討するため、野生型 Xror2 および細胞内ドメイン欠失変異体 Xror2-TM をアフリカツメガエル胚の腹側あるいは背側の中胚葉領域に過剰発現させ発生過程に対する影響を調べた。その結果、Xror2 により原腸陥入が著しく阻害されること、また予想外にも Xror2-TM は野生型と類似の活性を持つことが見いだされた。Xror2 の過剰発現細胞の挙動を検討するため、細胞系譜マーカーとして β -ガラクトシダーゼと共発現させて調べたところ、Xror2 と Xror2-TM は共に原腸陥入を引き起こす細胞運動の1つである収斂伸展運動を阻害することが明らかとなった。しかし後の神経胚期においては、Xror2 は神経溝形成および神経板の閉じを阻害するのに対して、Xror2-TM を発現させた胚では、色素に富んだ細胞が神経板に過形成され、神経溝が形成されることが明らかになった。それらをさらに確認するために、アニマルキャップを用いて検討した。アニマルキャップはアクチビン処理により伸長運動を伴う形態変化を起こすのだが、Xror2 および Xror2-TM を発現させたアニマルキャップではこの運動が阻害され、さらに、Xror2-TM を発現させたアニマルキャップにおいては、神経溝様の形成が観察された。この結果は先の細胞系譜実験の結果と良い一致を示した。

次に野生型 Xror2 と Xror2-TM とが形態形成運動において類似の表現型を示したことが、果たして同じ生物活性によるのか否かを検討した。そこで両者をアニマルキャップに単独あるいは共発現させて表現型を観察したところ、Xror2 と Xror2-TM の作用は拮抗的ではなく相加的に形態形成運動を阻害することが示された。したがって Xror2 の収斂伸長運動阻害活性はキナーゼ活性に非依存적と考えられる。この結論は、線虫のニューロンの細胞移動における Ror の役割がキナーゼ活性に非依存적であることと良く対応している。

さらに、Xror2 と Xror2-TM の細胞分化を対する影響を解析するために、これらを発現させた胚において神経分化マーカーの *nrp1* および脊索分化マーカーの XPA26 の発現を全胚インサイチュハイブリダイゼーションによって調べた。その結果 Xror2 と Xror2-TM の過剰発現によるこれらの分化マーカーの発現の変化は観察されず、神経および脊索の分化には影響を与えないことが示唆された。

以上の結果より、これらのことより Xror2 は細胞の分化形質には変化を与えないが、細胞外ドメインが主として収斂・伸展の調節に関わり、さらにキナーゼ領域を含む細胞内ドメインは神経板の閉じに関わることが示唆された。

収斂伸長運動とは中軸中胚葉と予定後脳脊髄領域の細胞が中軸に向かって収斂し、それに伴い前後軸に沿って組織全体が伸長する細胞運動であり、その結果予定前脳中脳領域と予定後脳脊髄領域とが分離されることになる。これまで収斂伸長運動には Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-11 による Wnt の非標準経路 (non-canonical pathway) が関わり、この経路の過度の活性化あるいは阻害により収斂伸長運動が阻害されることが報告されている。したがって、frizzled 様ドメインをもつ Xror2 と Wnt の非標準経路との相互作用により収斂伸長運動が制御されている可能性があり、その解析は今後の課題である。

本研究では、アニマルキャップアッセイと mRNA 注入法を利用することで、網羅的 Xlim-1 の下流遺伝子の検索を行い、オーガナイザーにおける分子基盤の解明を目指した。その結果、頭部形成もしくは、前方型神経誘導といったようなオーガナイザーの誘導活性に関わる遺伝子が、Xlim-1 の標的遺伝子の候補として新たに同定されるとともに、Xror2 の機能解析により、Xlim-1 を介した分子経路が、オーガナイザーの収斂伸展という形態形成運動にも関わることが示唆された。今後、未解析である XADAMTS-1, XPA26 等の機能解析を行うことで、さらにオーガナイザーの機能に関わる分子基盤の理解に繋がることが期待される。